

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Zur Gruppeneinteilung und Genetik
der Paraoxonase-Aktivität
im menschlichen Serum –
Vergleichende Untersuchungen
mit zwei verschiedenen Methoden

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Heinrich Grimm
aus Rollhofen

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg

Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Zur Gruppeneinteilung und Genetik
der Paraoxonase-Aktivität
im menschlichen Serum –
Vergleichende Untersuchungen
mit zwei verschiedenen Methoden

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Heinrich Grimm
aus Rollhofen

Gedruckt mit der Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.1980

G L I E D E R U N G

=====

I	Einleitung	1
II	Enzymatischer Abbau von Organophosphorsäureverbindungen	3
III	Problemstellung	13
IV	Experimentelle Untersuchungen	14
	Methoden der Paraoxonasemessung	
	1. Spektrophotometrischer Test nach <u>Krisch</u> (1968a)	
	a) Versuchsanordnung	
	b) Ansatz	
	c) Berechnung der Paraoxonase-Aktivität	
	2. Anti-ChE-Technik (<u>Geldmacher- v. Mallinckrodt</u> et al., 1969)	
	a) Herstellung der Lösungen	
	b) Vorbereitung der Seren	
	c) Inkubation mit E 600 (Paraoxon)	
	d) Messung der Serumcholinesterase-Restaktivität	
	e) Berechnung der Serumcholinesterase-Restaktivität	
V	Ergebnisse und Auswertung	23
	1. Auswertung der Ergebnisse mit der spektrophotometrischen Methode nach <u>Krisch</u> (1968a)	
	2. Auswertung der Ergebnisse nach der Anti-ChE-Technik (<u>Geldmacher-v. Mallinckrodt</u> et al., 1969)	
	3. Vergleich beider Methoden und Prüfung der Genetik der Paraoxonasetypen	
VI	Diskussion	35
VII	Zusammenfassung	37
VIII	Literaturverzeichnis	39



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I E I N L E I T U N G

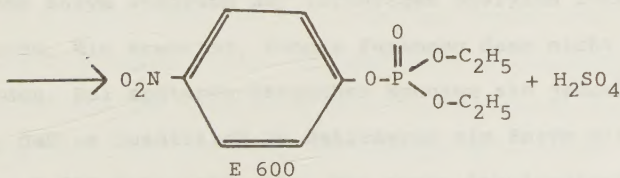
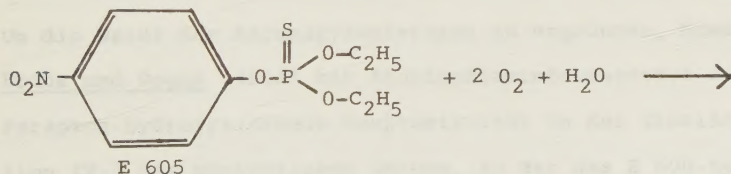
=====

Organische Phosphorverbindungen wurden seit den dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts auf verschiedenen Gebieten eingesetzt.

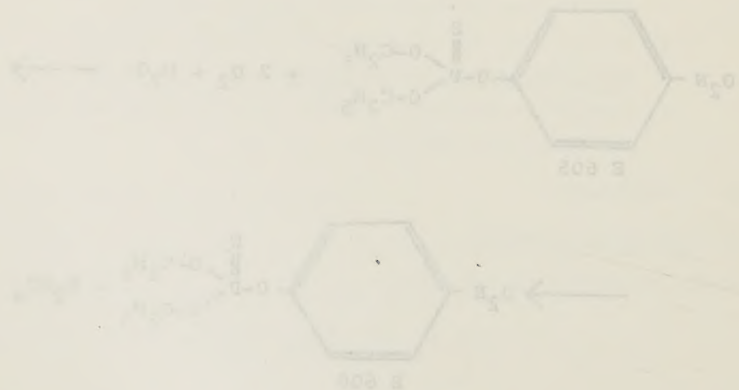
Schrader (1937) gelang es, die Grundstruktur der zu dieser Gruppe gehörenden Alkylphosphate darzustellen. Gleichzeitig entdeckte er die insektizide Wirkung dieser Verbindungen.

E 605 (0,0-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thionophosphat) hat sich zu den bekanntesten Vertreter dieser Stoffklasse entwickelt und ist heute durch seine Verwendung als Schädlingsbekämpfungsmittel weit verbreitet.

Im Warmblüterorganismus erfolgt der Austausch des Schwefels gegen Sauerstoff, wodurch Paraoxon, E 600 (0,0-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) entsteht, was eine erhebliche Verstärkung der Giftwirkung zur Folge hat.



Wegen der weitgehend irreversiblen Hemmung der Acetylcholinesterasen durch E 600 kann Acetylcholin dann nicht mehr abgebaut werden. Dadurch kommt es zu einer Dauerdepolarisation an den cholinergen Synapsen und den entsprechenden Vergiftungssymptomen.



II ENZYMATISCHER ABBAU VON
=====

ORGANOPHOSPHORSÄUREVER-
=====

BINDUNGEN
=====

Aldridge (1953 a+b) fand im menschlichen Serum ein Para-oxon-hydrolysierendes Enzym, die E 600-Esterase, das nach seinen Untersuchungen der schon vorher von ihm entdeckten A-Esterase (Arylesterase) entsprach.

Augustinsson (1954), Augustinsson und Heimbürger (1954+1955) entdeckten ebenfalls im menschlichen Serum ein E600-hydrolysierendes Enzym. Da es aber auch andere organische Phosphorverbindungen hydrolysierte, nannten sie es Phosphorylphosphatase.

Main (1960) konnte dann die geleisteten Arbeiten bestätigen, indem er die Paraoxonase im Schafserum in 80-95%ig reiner Form darstellte.

Um die Natur der Serumarylesterasen zu ergründen, hemmten Erdös und Boggs (1961) mit Äthylendiamintetraacetat die Paraoxon-hydrolysierende Hauptaktivität in der Eiweißfraktion IV-1 des menschlichen Serums, in der das E 600-hydrolysierende Enzym aufgrund der vorherigen Analysen lokalisiert wurde. Wie erwartet, konnte Paraoxon dann nicht abgebaut werden. Bei späteren Versuchen konnten sie jedoch feststellen, daß es zusätzlich im Nativserum ein Enzym mit spezifischer E 600 Aktivität gibt, das gegen Äthylendiaminte-

traacetat resistent ist und der Humanalbuminfraktion V angehört.

Neben der E 600-spaltenden Aktivität in der Humanalbuminfraktion V fanden Skrinjarik-Spoljar und Reiner (1968) im Nativserum ein Enzym mit ausgesprochener Paraoxonase-Aktivität.

Krisch (1968 a) untersuchte die enzymatische Hydrolyse von Paraoxon durch menschliches Serum an 50 Probanden. Er maß in einem spektrophotometrischen Test die Extinktion des durch Hydrolyse aus E 600 freigesetzten p-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 405 nm, einem pH-Wert von 11,2 und einer Temperatur von 25,3°C. Er kam zu dem Ergebnis, daß hinsichtlich der Paraoxonase-Aktivität im menschlichen Serum zwei sich überlagernde Gruppen von Normalpersonen unterschieden werden können. Er wies allerdings einschränkend darauf hin, daß es im Einzelfall wegen des großen Überlagerungsbereiches meist nicht sicher möglich ist, eine bestimmte Versuchsperson einer der beiden Gruppen zuzuordnen. Krisch zog in Erwägung, daß die erstmals von ihm bemerkten Aktivitätsunterschiede genetisch bedingt sein könnten.

Geldmacher-v. Mallinckrodt, Rabast und Lindorf (1969) stellten Unterschiede in der Vergiftbarkeit menschlicher Serumcholinesterasen mit E 600 fest. Die Messung erfolgte in der Warburg-Apparatur nach der Methode von Friedberg und Sakai (1958) (Substrat:Acetylcholin) nach Inkubation (60 Minuten, 37 °C, pH-Wert von 7,7) mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration (Anti-ChE-Technik). Es ergab sich unabhängig von der Aus-

gangsaktivität der Cholinesterase bei 75 Probanden eine Aufteilung in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität (s. Tab. 1).

Tabelle 1

Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung von 75 menschlichen Serumproben mit E 600 ($c=3,2 \times 10^{-8}$ M) und Aufteilung in drei Gruppen nach Geldmacher-v. Mallinckrodt, Rabast und Lindorf (1969)

Gruppe	Anzahl der Personen	Restaktivität in % der Ausgangsaktivität	Einstufung
I	38	0 - 5,5	niedrig
II	22	13 - 21	mittel
III	15	29 - 51	hoch

Geldmacher-v. Mallinckrodt et al. (1972) konnten an 50 Probandenserum eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600, gemessen mit der Anti-ChE-Technik, und der Aktivität der E 600-spaltenden Paraoxonase, spektrophotometrisch bestimmt nach Krisch (1968a), nachweisen. Der errechenbare Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,82$.

Um die Richtigkeit ihrer Einteilung menschlicher Seren in drei Gruppen mit unterschiedlicher Serumcholinesterase-Restaktivität weiter zu sichern, nahmen Geldmacher-v. Mallinckrodt et al. (1973) Untersuchungen an 192 menschlichen Seren mit der Anti-ChE-Technik vor. Dabei war eine Aufteilung in drei gut getrenn-

te Gruppen mit unterschiedlicher Serumcholinesterase-Restaktivität mit 99,9 %iger Wahrscheinlichkeit (t-Test) erkennbar.

Es stellte sich nun die Frage, wie der Polymorphismus der menschlichen Paraoxonase zu erklären sei. Schon Krisch (1968a) zog bei seiner Einteilung in zwei Gruppen mit unterschiedlicher Paraoxonaseaktivität eine genetische Determination in Erwägung. Untersuchungen von Geldmacher-v. Mallinckrodt et al. (1973) an 35 Familien mit 52 Kindern mittels der Anti-ChE-Technik zeigten, daß es möglich ist, den Polymorphismus der menschlichen Serumparaoxonase als Folge genetischer Determination aufzufassen, wenn man ein einfaches 2-Allele-Modell zugrunde legt. Die Ergebnisse dieser Versuche veranlaßten sie, die verschiedenen Paraoxonasetypen neu zu benennen, obwohl noch ungeklärt war, ob die Aktivitätsunterschiede durch quantitative Unterschiede des gleichen Enzyms oder durch das Vorliegen verschiedener Enzyme bedingt sind. Die Bezeichnungen der Paraoxonasetypen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2

Gewählte Bezeichnung für die Paraoxonasetypen

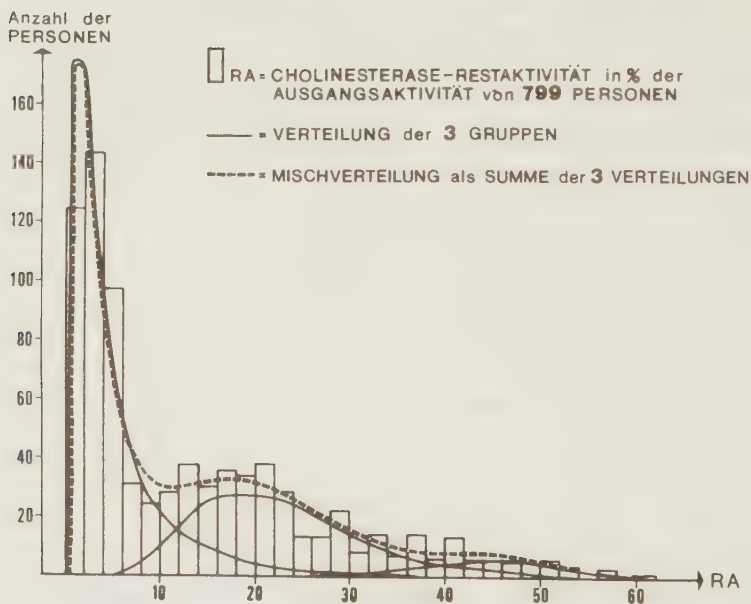
Serumcholinesterase-Restaktivität (Anti-ChE-Technik)	Serumparaoxonase-Aktivität	<u>Paraoxonasetyp</u>	
		früherer Name	neuer Name
niedrig	niedrig	Gruppe I	1 - 1
mittel	mittel	Gruppe II	2 - 1
hoch	hoch	Gruppe III	2 - 2

Dumbach (1976) faßte in einer statistischen Auswertung die Ergebnisse von Untersuchungen über die Cholinesterase-Restaktivität zusammen, die in der Zeit von 1970-1976 an dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg vorgenommen worden waren. Berücksichtigt wurden 799 Werte von 601 Einzelpersonen und von 99 Elternpaaren aus Familienuntersuchungen.

Das Histogramm dieser 799 Werte (s. Abb. 1) zeigt eine Mischverteilung aus drei Verteilungen mit niedriger, mittlerer und hoher Cholinesterase-Restaktivität als Ausdruck der drei Paraoxonasetypen. Diese Einteilung der drei Gruppen mit verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität wird von uns heute aufgrund des umfangreichen Zahlenmaterials dieser Arbeit als richtig angesehen.

Abbildung 1

Häufigkeitsverteilung der Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($c=3,2 \times 10^{-8}$ M) bei 799 nicht blutsverwandten Personen



Aufgrund dieser Ergebnisse legten Geldmacher-v. Mallinckrodt, Hommel et Dumbach (1979) die Grenzen der Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität neu fest (s.Tab.3).

Tabelle 3

Serumcholinesterase-Restaktivität in % der Ausgangsaktivität nach Vergiftung von 799 Serumproben nicht blutsverwandter Personen mit E 600 ($c=3,2 \times 10^{-8}$ M) und Aufteilung in drei Gruppen

Gruppe	Restaktivität in % der Ausgangsaktivität	Einstufung
I	0 - 11,1	niedrig
II	11,2 - 38,9	mittel
III	$\geq$ 39,0	hoch

Die nicht völlig übereinstimmenden Grenzen der drei Gruppen und ihre Trennung durch Intervalle dürften bei Geldmacher-v. Mallinckrodt et al. (1969) durch die geringe Fallzahl zu Beginn der Untersuchungen bedingt gewesen sein.

Dumbach (1976) konnte durch die Anwendung eines Iterationsverfahrens Schätzwerte für die prozentuale Verteilung der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($c=3,2 \times 10^{-8}$ M) in der Bevölkerung errechnen. Schätzwerte und 5 % Konfidenzintervalle sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Es wurden dieselben Bezeichnungen wie in Tabelle 2 gewählt.

Tabelle 4

Schätzwerte und 5 %-Konfidenzintervalle für die prozentuale Verteilung der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität und damit der drei Paraaxonasetypen in der Bevölkerung

Paraaxonasetyp	prozentuale Verteilung	5 %-Konfidenzintervalle
1 - 1	57,9	[54,43; 61,39]
2 - 1	36,1	[32,77; 39,54]
2 - 2	6,0	[4,42; 7,84]

Zech und Zürcher (1974) untersuchten spektrophotometrisch die Aktivitätsverteilung der Serumparaaxonase (Arylesterase, E C 3.1.1.2), von ihnen Phosphorylphosphatase genannt, an 619 Versuchspersonen. Gemessen wurde die Aktivität der Serumphosphorylphosphatase anhand der Extinktion des aus Paraaxon abgespalteten p-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 400 nm, bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 25°C. In Abbildung 2 (schwarze Säulen) sind ihre Ergebnisse dargestellt, die sie als bimodale Verteilung der Paraaxonase-Aktivität deuteten.

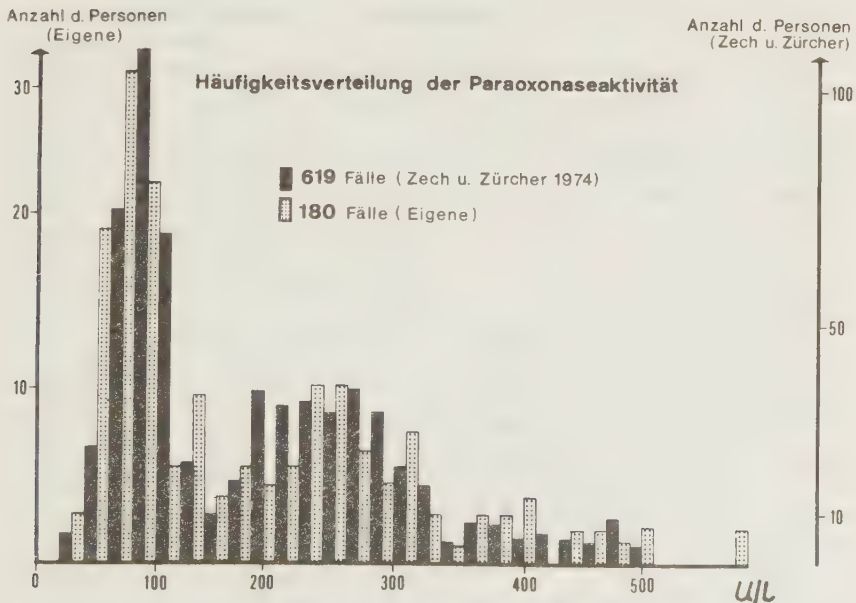
Baumgartner (1970), Burgis (1972), Dietzel (1974), Flügel (1977), Metzner (1973), Nirschl (1972) und Renner (1973) untersuchten am Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg an 180 Probanden die Paraaxonase-Aktivität nach der direkten spektrophotometrischen Methode von Krisch (1968a).

In Abbildung 2 (weiße Säulen) sind ihre Messungen wiedergegeben und als "eigene Fälle" gekennzeichnet.

Der Vergleich der beiden Untersuchungen ergibt annähernd dasselbe optische Bild. Das Histogramm zeigt aber nach unserer Ansicht eine Mischverteilung aus drei Verteilungen mit niedriger, mittlerer und hoher Paraoxonase-Aktivität.

Abbildung 2

Häufigkeitsverteilung der Paraoxonase-Aktivität nach Untersuchungen von Zech und Zürcher (1974) und nach Untersuchungen am Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg



Geldmacher- v. Mallinckrodt et al. (1973) fanden bei der Untersuchung von 257 menschlichen Serumproben mit der spektrophotometrischen Methode von Krisch (1968a) wiederum drei Gruppen mit unterschiedlicher Paraoxonase-Aktivität. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Wie schon Krisch (1968a) erkannte, ist in den Grenzbereichen eine sichere Zuordnung einer Paraoxonase-Aktivität zu einem Paraoxonasetyp nicht möglich.

Tabelle 5

Serumparaoxonase-Aktivität von 257 menschlichen Seren in U/l, gemessen mit der spektrophotometrischen Methode von Krisch (1968a)

n	Gruppe	Paraoxonase-Aktivität (U/l)	
		gemessene Werte	mittlere Aktivität mit Standardabweichung
132	I	30 - 189	$97,1 \pm 36,3$
97	II	190 - 350	$262,3 \pm 41,4$
28	III	> 350	$449,6 \pm 79,4$

III P R O B L E M S T E L L U N G

=====

Für die Messung der Aktivität der menschlichen Serumpa-
raoxonase sind zwei verschiedene Methoden entwickelt wor-
den: zum einen die Bestimmung der Serumcholinesterase-Rest-
aktivität in Prozent der Ausgangsaktivität nach Vergiftung
mit Paraoxon ($c=3,2 \times 10^{-8}$ M) (Anti-ChE-Technik nach Geld-
macher-v. Mallinckrodt et al. 1969) und zum anderen die
spektrophotometrische Messung der Aktivität der E 600-spal-
tenden Serumpa-oxonase nach Krisch (1968a) über das abge-
spaltene p-Nitrophenol.

Geldmacher-v. Mallinckrodt et al. (1972) konnten eine hoch-
signifikante Korrelation zwischen den Einzelwerten der bei-
den Methoden nachweisen. Ein Widerspruch ergab sich aller-
dings aus der Tatsache, daß bei der Anti-ChE-Technik eine
Aufteilung der Cholinesterase-Restaktivität in drei Gruppen
möglich war, während Krisch (1968a) und Zech und Zürcher (1974)
nach der direkten spektrophotometrischen Methode eine Auftei-
lung in zwei Gruppen annahmen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, 59 Probandenserum so-
wohl nach der Anti-ChE-Technik (Geldmacher-v. Mallinckrodt
et al. 1969) als auch nach der Methode von Krisch (1968a) zu
messen. Es sollte festgestellt werden, ob die Einzelpersonen
nach beiden Verfahren der gleichen Gruppe zugeordnet werden
können; in Fällen, wo dies nicht ohne weiteres möglich war,
sollten die bisher angenommenen Gruppengrenzen unter Ausnut-
zung der Tatsache korrigiert werden, daß es sich bei den Pro-
banden um Angehörige von Familien handelte.

IV EXPERIMENTELLE UNTER -
=====

SUCHUNGEN
=====

Die Untersuchungen wurden mit den Blutseren von 59 Personen aus 15 Familien durchgeführt. Die Probanden litten zum Zeitpunkt der Blutentnahme wesentlich an keiner Erkrankung, insbesondere nicht an Leberkrankheiten und an Diabetes mellitus.

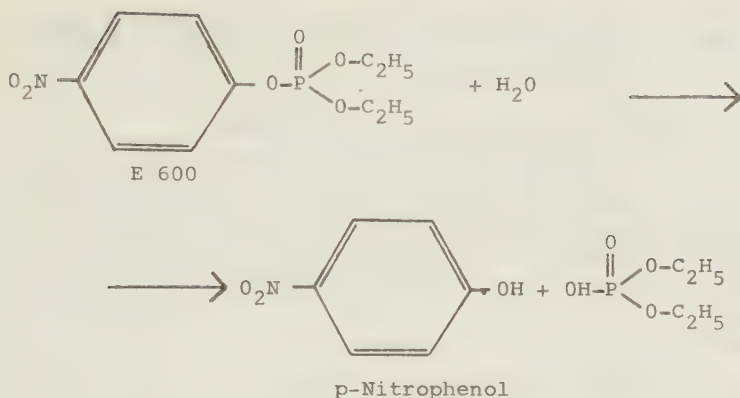
Zur Gewinnung des Serums wurde mit einer Serum-Monovette^R je 10 ml Blut abgenommen und anschließend 15 Minuten lang bei 1600 U/min. zentrifugiert, wobei das überstehende Serum nicht hämolytisch sein durfte. Das gewonnene Serum wurde sofort abgetrennt und bei + 4 ° C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Messungen erfolgten spätestens nach 2 Tagen.

Methoden der Paraoxonase-messung

Zur Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität des menschlichen Serums fanden zwei verschiedene Meßmethoden Anwendung, die in diesem Abschnitt erläutert werden.

1. Spektrophotometrischer Test nach Krisch (1968a)

Grundlage dieser Methode ist, daß p-Nitrophenol durch enzymatische Hydrolyse aus Paraoxon ($c=10^{-4}$ M) nach folgender Gleichung freigesetzt wird:



Mit einem Spektralphotometer wurde die Extinktion des abgespalteten p-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 405 nm, einem pH-Wert von 11,2 und einer Temperatur von 25°C gemessen. Die freigesetzte Menge an p-Nitrophenol ist ein Maß für die Aktivität der Serumpaeroxonase.

a) Versuchsanordnung

Zunächst wurden die folgenden Lösungen hergestellt und in Flaschen abgefüllt (sie konnten über einen längeren Zeitraum verwendet werden):

0,1 M Trispuffer; pH-Wert: 8

0,1 M Glycin-NaOH-Puffer; pH-Wert: 11,2

0,9 %ige NaCl-Lösung

Kurz vor den Versuchen erfolgte die Bereitstellung von:

E 600-Stammlösung: 0,065 ml E 600 aufgefüllt mit 0,1 M Trispuffer auf 25ml ($c=1,2 \times 10^{-2} \text{M}$); 10 min. lang im Erlenmeyerkolben kräftig geschüttelt.

E 600-Gebrauchslösung: E 600-Stammlösung 1:5 mit Aqua bidest.
verdünnt.

Serum: 1:5 mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt.

Im Gegensatz zu Krisch (1968a) verzichteten wir bei der Herstellung der Stammlösung auf den Zusatz von Äthylenglykol, da dieses die Serumparaoxonase hemmt (Schuckmann, in Vorb.).

b) Ansatz

In ein Reagenzglas wurden pipettiert:

0,5 ml Serumverdünnung + 3,3 ml Glycin-NaOH Puffer (pH-Wert: 11,2). Nach 30 sec. Inkubation starteten wir die Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml E 600-Gebrauchslösung. Sofort nach Zugabe der E 600-Gebrauchslösung wurde der Ansatz in eine Küvette gefüllt und in den einen Probenhalter des Photometers gestellt. In den anderen Probenhalter gaben wir eine Küvette mit dem Leerwert, der statt des Serums 0,9 %ige NaCl-Lösung enthielt und mitgeführt wurde, um die E 600 Spontanhydrolyse zu messen.

Nach 30 sec. (E_0) und nach 180 sec. (E) wurde die Extinktion registriert. Um die Meßgenauigkeit zu erhöhen, führten wir jede Messung viermal durch und bildeten anschließend das arithmetische Mittel aus den Einzelwerten.

c) Berechnung der Paraoxonase-Aktivität

Zunächst bestimmten wir die Extinktionsdifferenz $\Delta E = E - E_0$ abzüglich der Extinktionsdifferenz des Leerwertes. Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenz in μMol abgespaltenes p-Nitrophenol diente der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitro-

phenol (in Glycin-NaOH Puffer, pH-Wert: 11,2):

$$\epsilon_{405 \text{ nm}} = .18,05 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$$

10 μ Mol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten danach (bei d=1cm und $\lambda = 405 \text{ nm}$) eine Extinktion von 0,1805. Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung auf einen ml Serum durch Multiplikation mit 10), der Meßzeit (Umrechnung auf eine Minute durch Division mit 2,5) und des Ansatzvolumens (4,8 ml; Multiplikation mit 4,8) errechnet sich die Aktivität (in μ Mol $\times \text{Min.}^{-1} \times \text{l}^{-1}$ Serum) nach folgender Formel:

$$\begin{aligned} \text{Aktivität} &= \frac{\Delta E \times 10 \times 4,8 \times 10}{0,1805 \times 2,5} \quad (\text{U/l Serum}) \\ &= \Delta E \times 1063 \quad (\text{U/l Serum}) \end{aligned}$$

2. Anti-ChE-Technik (Geldmacher-v. Mallinckrodt et al., 1969)

Mit ihr wird die Serumcholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($c=3,2 \times 10^{-8} \text{ M}$) ermittelt.

Als Substrat dient Butyrylcholinjodid. Diese Substanz hat gegenüber dem häufig verwendeten Acetylcholin den Vorteil, daß sie nur von der (Pseudo-) Cholinesterase des Serums (E C 3.1.1.8), nicht aber von der Acetylcholinesterase der Erythrozyten (E C 3.1.1.7) abgebaut wird und somit ein spezifischer enzymatischer Test im Serum möglich ist. Außerdem entwickelt sich bei dieser Methode etwa doppelt soviel CO_2 pro Zeiteinheit als bei der Verwendung von Acetylcholin, was eine Verkürzung der Messung zur Folge hat.

Die Grundlage dieses Verfahrens besteht in der äquivalenten Freisetzung von CO_2 durch Buttersäure, die aus Butyrylcholinjodid durch die enzymatische Wirkung der Cholinesterase entsteht. Die Cholinesterase wird durch Paraoxon gehemmt, dieses aber durch die Paraoxonase im unterschiedlichen Maße gespalten. Aus dem Verhältnis der CO_2 -Entwicklung durch Serum mit und ohne den Zusatz von Paraoxon kann ein Maß für die Aktivität der Paraoxonase erhalten werden.

Die Serumcholinesterase-Restaktivität wurde in der Warburg-Apparatur Typ-V-85 der Firma Braun, Melsungen, nach der manometrischen Methode von Ammon (1934), modifiziert nach Friedberg und Sakai (1958), bei einem pH-Wert von 7,2 und einer Temperatur von 37°C gemessen. An der Warburg-Apparatur sind 14 Manometer angebracht, die mit Brodie'scher Lösung gefüllt sind.

Die Versuchsansätze wurden in die Warburggefäße pipettiert. Diese bestehen aus einem Reaktions- oder Hauptraum mit Glaschliff, der an den einen Schenkel eines Manometers befestigt wird, und einer Anhangsbirne, die mit einem Schliffstopfen verschlossen werden kann.

In einem Versuchsablauf konnten drei verschiedene Seren untersucht werden, wobei jeweils zwei unvergiftete (ohne Paraoxon) und zwei vergiftete (mit Paraoxon) Ansätze gemessen wurden. Gleichzeitig führten wir zwei Leerwerte mit, die zur Kontrolle der Eigenhydrolyse dienten.

a) Herstellung der Lösungen

Folgende Lösungen mußten angesetzt werden:

Verdünnungslösung: Mischung von 10 Teilen einer 0,9 %igen NaCl-Lösung und 3 Teilen einer 1,26 %igen NaHCO_3 -Lösung.

Paraoxonlösung: Mit einer geeichten Mikropipette wurde 1 μl (Giftlösung) E 600 auf 90 ml aqua bidest. gegeben und 8 min. lang im Erlenmeyer-Kolben gut geschüttelt; danach Mischung von 10 μl dieser Lösung mit 13,5 ml der Verdünnungslösung.

Butyrylcholinjodidlösung: 0,546 g Trockensubstanz gelöst in 100 ml aqua bidest.

b) Vorbereitung der Seren

In 6 Reagenzgläser (Doppelbestimmung für 3 Probanden) wurden je 0,15 ml Serum und 1,35 ml Paraoxonlösung gegeben, so daß eine $3,2 \times 10^{-8}$ molare E 600-Konzentration vorlag. Diese Seren erhielten die Aufschrift: "vergiftet".

Danach wurde in 6 weiteren Reagenzgläsern 0,15 ml Serum mit 1,35 ml Verdünnungslösung angesetzt und als "unvergiftet" bezeichnet.

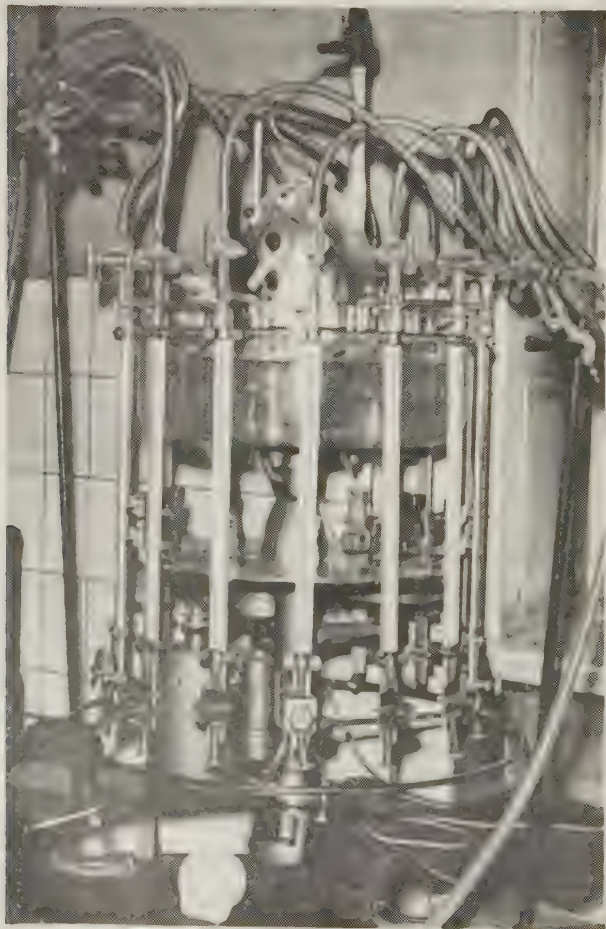
c) Inkubation mit E 600 (Paraoxon)

Je 0,5 ml dieser Serumverdünnungen pipettierten wir in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes, das im Hauptraum 1,5 ml der 0,546 %igen Butyrylcholinjodid-Lösung enthielt. In zwei Warburggefäßen befand sich statt der Seren 0,5 ml der Verdünnungslösung (Leerwert). Danach befestigten wir die 14 Warburggefäße nach Einfetten der Glasschliffe an den Manometern

und tauchten sie in das Wasserbad des Warburgapparates mit einer Temperatur von 37°C ein. Dann begann unter Schütteln die Begasung aller Manometer mit einem Gasgemisch aus 5 % CO_2 und 95 % N_2 . Die beschriebene Anordnung ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

Abbildung 3

Warburg-Apparatur Typ-V-85 der Firma Braun, Melsungen



d) Messung der Serumcholinesterase-Restaktivität

Während einer Inkubation von 60 min. wurde eine Begasung von 20 min. durchgeführt. Danach erfolgte der Start der Reaktion, indem die Serumverdünnungen aus der Anhangsbirne in den Reaktionsraum der Warburggefäße gekippt und die Anhangsbirne durch den Schliffstopfen verschlossen wurden. Der pH-Wert lag nun bei 7,2 (Süllmann, 1964).

Bei noch geöffneten Manometerhähnen wurde drei Minuten lang geschüttelt, danach die Manometervordifferenz abgelesen und anschließend wurden die Manometerhähne geschlossen. Nun lief die Reaktion in einem luftdicht verschlossenen Raum bei einer Schüttelfrequenz von 100/min. ab. Nach 30 Minuten Laufzeit lassen wir die Manometerstände ab. Die Messung wurde in einem zweiten Versuchsablauf wiederholt, so daß von jedem Serum vier Werte mit und vier Werte ohne Vergiftung vorlagen.

e) Berechnung der Serumcholinesterase-Restaktivität

Die zuvor notierten Manometervordifferenzen wurden von den nach 30 min. gemessenen Werten abgezogen und mit den jeweils entsprechenden Manometerkonstanten multipliziert. Ebenso wurde der Leerwert errechnet.

Die für jedes einzelne Manometer zu bestimmende Konstante ergibt sich nach Süllmann (1964) aus folgender Formel:

$$K = \frac{V_G \times \frac{273}{T} \times V_F \times a}{p_O}$$

Dabei gilt: V_G = Volumen des Gasraumes
 T = Versuchstemperatur
 V_F = Volumen der Flüssigkeit
 a = Absorptionskoeffizient
 P_0 = Normaldruck

Nach Bildung des arithmetischen Mittels aus den Wertepaaren der Doppelansätze ist der Leerwert von der Enzymmessung abzuziehen. Die Angabe der Aktivität erfolgt in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min.}$ bezogen auf 0,15 ml Serum. Die Restaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität ist ausgedrückt durch das Verhältnis des ermittelten Wertes nach Vergiftung mit E 600, multipliziert mit 100, zum entsprechenden Wert ohne Vergiftung.

Auf die gleiche Weise wurde der zweite Versuchsablauf ausgewertet und aus der für jedes Serum zweifach bestimmten Serumcholinesterase-Restaktivität wiederum das arithmetische Mittel gebildet. Die vom Rechner auf vier Stellen hinter dem Komma errechneten Restaktivitäten wurden auf eine Stelle nach dem Komma gerundet, was der Messgenauigkeit entspricht.

V E R G E B N I S S E U N D A U S W E R T U N G

=====

Für die Untersuchung stellten sich 59 Personen aus 15 Familien zur Verfügung.

In Tabelle 6 sind die Einzelwerte der Messungen nach der spektrophotometrischen Methode nach Krisch (1968a) und nach der Anti-ChE-Technik (Geldmacher-v. Mallinckrodt et al., 1969) dargestellt. Die Ergebnisse wurden nach Familien geordnet, wobei die Namen der Eltern unterstrichen sind.

Tabelle 6

Paraoxonase-Aktivität in U/l Serum und Serumcholinesterase-Restaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität nach Vergiftung mit E 600 bei 15 Familien

Familiennamen	Vorname	photometrische Methode (U/l Serum)	Anti-ChE-Technik (Restaktivität in % der Ausgangsaktivität)
Allraun	<u>Gerd</u>	77,60	4,87
	<u>Anneliese</u>	260,44	26,59
	Horst	191,34	12,88
	Frank	42,52	0,99
Bär	<u>Georg</u>	59,53	1,59
	<u>Anna</u>	163,70	11,05
	Renate	197,72	14,65
Bierlein	<u>Georg</u>	319,96	36,16
	<u>Annemarie</u>	181,77	13,40
	<u>Martina</u>	175,66	13,19
	Annette	292,59	29,48
Britting	<u>Heinrich</u>	81,85	5,46
	<u>Hilde</u>	299,77	33,89
	Ingrid	182,83	13,72
	Hubert	199,80	15,00

Familiennamen	Vorname	photometrische Methode (U/l Serum)	Anti-ChE-Technik (Restaktivität in % der Ausgangsaktivität)
Gebhard	<u>Erhard</u>	221,10	18,21
	<u>Rosa</u>	213,66	16,41
	<u>Josef</u>	542,13	53,68
Greiner	<u>Emil</u>	69,15	2,82
	<u>Wilhelmine</u>	327,00	38,82
	<u>Gerd</u>	215,78	16,91
	<u>Theo</u>	201,97	15,44
Grimm	<u>Hans</u>	56,34	1,02
	<u>Margarete</u>	62,72	2,09
	<u>Barbara</u>	68,03	2,93
Löhr	<u>Georg</u>	224,29	18,21
	<u>Luise</u>	58,46	1,69
	<u>Konrad</u>	217,91	18,65
Müller *	<u>Hans</u>	235,99	24,28
	<u>Rosa</u>	180,98	12,76
	<u>Siegfried</u>	166,09	11,07
	<u>Beate</u>	252,46	25,13
	<u>Rudolf</u>	70,96	2,80
Müller *	<u>Karl</u>	61,65	1,32
	<u>Marliese</u>	68,03	2,53
	<u>Elke</u>	94,61	6,33
Maier	<u>Sebastian</u>	72,28	3,09
	<u>Bernharda</u>	220,04	17,43
	<u>Theo</u>	70,16	2,00
	<u>Inge</u>	220,57	18,54
	<u>Stefan</u>	253,53	24,49
Pinzer	<u>Michael</u>	80,79	4,97
	<u>Margarete</u>	62,72	2,33
	<u>Barbara</u>	95,67	6,72

* nicht verwandt

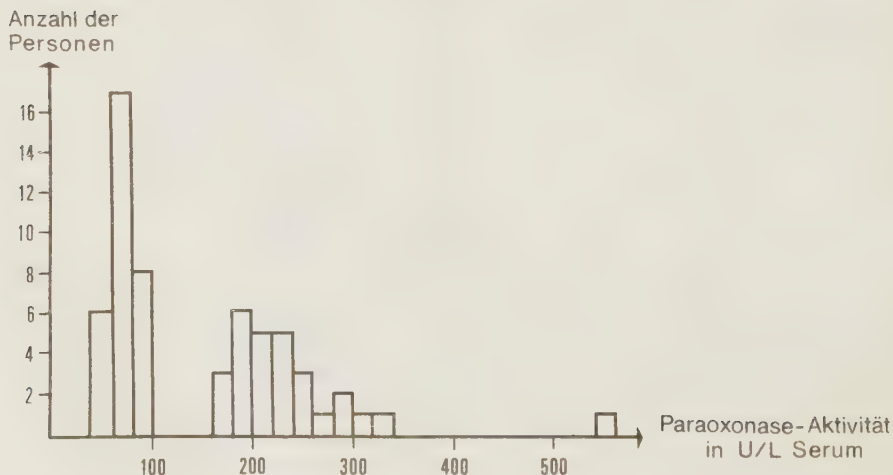
Familienname	Vorname	photometrische Methode (U/l Serum)	Anti ChE-Technik (Restaktivität in % der Ausgangsaktivität)
Schmidt	<u>Wilhelm</u>	66,97	2,23
	<u>Emmi</u>	99,92	7,21
	Eva	56,34	0,96
	Gisela	94,61	6,59
	Rolf	80,79	4,75
	Udo	89,29	6,54
Schwab	<u>Fritz</u>	59,53	1,56
	<u>Anna</u>	61,65	1,19
	Angela	60,59	1,57
	Hermann	71,22	2,86
	Richard	74,41	2,54
Strobel	<u>Heinrich</u>	242,36	22,49
	<u>Lina</u>	65,91	2,65
	Irmi	206,22	15,17
	Hermann	79,73	5,58

1. Auswertung der Ergebnisse mit der spektrophotometrischen Methode nach Krisch (1968a)

Wenn man die Werte nach steigender Paraoxonase-Aktivität ordnet und in einem Histogramm aufträgt, ergibt sich die in Abbildung 4 wiedergegebene Häufigkeitsverteilung.

Abbildung 4

Häufigkeitsverteilung der Paraoxonase-Aktivität bei 15 Familien



Es ergeben sich drei Gruppen mit unterschiedlicher Paraoxonase-Aktivität, die sich nicht überschneiden, sondern durch Intervalle voneinander getrennt sind. Das optische Bild der Verteilung stimmt weitgehend mit dem Histogramm der Ergebnisse von Zech und Zürcher (1974) und den eigenen Fällen (s. Abb.2 Seite 11) überein. Die Trennung der Gruppen verschiedener hoher Paraoxonase-Aktivität durch Intervalle ist durch die geringe Fallzahl zu erklären. Ebenfalls wegen der geringen Fallzahl und aufgrund des niedrigen prozentualen Anteils des hohen Typs der Paraoxonase-Aktivität in der Bevölkerung, den Dumbach (1976) mit 6 Prozent angab (s. Tab.4 Seite 10), ist es zu erklären, daß wir für den hohen Paraoxonasetyp nur einen Probanden angeben können. Es ist jedoch unmöglich, den Wert von 542,13 U/l Serum der mittleren Gruppe zuzuordnen. Auch Krisch (1968b) hatte bei seinen Untersuchungen Probanden mit hoher Paraoxonase-Aktivität gefunden, sie jedoch nicht bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt.

Die Grenzen für die Einstufung unserer Probanden in drei Gruppen verschieden hoher Paraoxonase-Aktivität sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7

Serumparaoxonase-Aktivität von 59 menschlichen Seren in U/l Serum, gemessen mit der spektrophotometrischen Methode von Krisch (1968a), und Aufteilung in drei Gruppen

Gruppe	Anzahl der Personen	gemessene Werte (U/l Serum)	Einstufung
I	31	40 - 100	niedrig
II	27	160 - 350	mittel
III	1	> 350	hoch

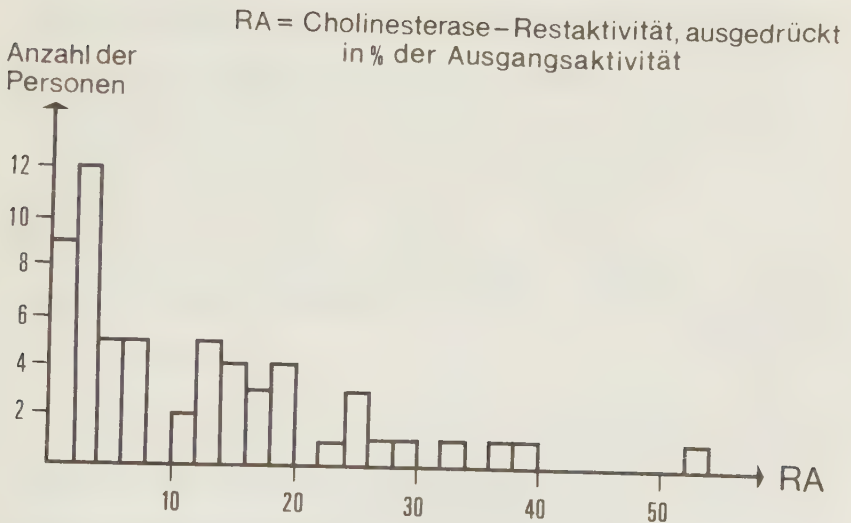
Ein Vergleich der gewonnenen Werte mit den Ergebnissen von Geldmacher-v. Mallinckrodt et al. (1973) (s. Tab. 5 Seite 12) soll weiter unten bei der Diskussion der Ergebnisse vorgenommen werden.

2. Auswertung der Ergebnisse nach der Anti-ChE-Technik
(Geldmacher-v. Mallinckrodt et al., 1969).

Die Einzelwerte wurden wiederum nach steigender Serumcholinesterase-Restaktivität geordnet und in ein Histogramm eingetragen (s. Abb. 5).

Abbildung 5

Gesamtverteilung der Paraoxonase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \times 10^{-8}$ M) bei 15 Familien



Das Histogramm zeigt große Übereinstimmung mit der von Dumbach (1976) gefundenen Häufigkeitsverteilung der Cholinesterase-Restaktivität (s. Abb. 1 Seite 8).

Wegen der schon weiter oben erwähnten Gründe können wir für den hohen Typ der Serumcholinesterase-Restaktivität nur einen Probanden angeben, der jedoch auch bei der Methode nach Krisch (1968a) der einzige Vertreter des hohen Typs der Paraoxonase-Aktivität ist. Das optische Bild spricht für eine Verteilung aus drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Cholinesterase-Restaktivität als Ausdruck der drei Paraoxonasetypen.

Aufgrund der eigenen Untersuchung und unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Geldmacher-v. Mallinckrodt, Hommel et Dumbach (1979) geben wir in Tabelle 8 die Grenzen der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität wieder.

Obwohl in den Grenzbereichen eine sichere Zuordnung nicht möglich ist, wird ebenfalls in Tabelle 8 eine Einstufung in drei Gruppen mit unterschiedlicher Cholinesterase-Restaktivität vorgenommen.

Tabelle 8

Serumcholinesterase-Restaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität von 59 menschlichen Seren nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \times 10^{-8}$ M) (Anti-ChE-Technik nach Geldmacher-v. Mallinckrodt et al., 1969)

Gruppe	Anzahl der Personen	Restaktivität in % der Ausgangsaktivität	Einstufung
I	31	0,9 - 7,2	niedrig
II	27	11,0 - 39,0	mittel
III	1	> 39,0	hoch

3. Vergleich beider Methoden und Prüfung der Genetik der Paraoxonasetypen

Nach der erfolgten Gruppeneinstufung muß noch geprüft werden, ob jeder einzelne Proband nach der Bestimmung seiner Paraoxonase-Aktivität bzw. Serumcholinesterase-Restaktivität derselben Gruppe zugeordnet werden konnte. Wie aus Tabelle 9 zu ersehen ist, ist dies für jede Person der Fall. Da es sich um eine Familienuntersuchung handelte, ist es außerdem möglich, Angaben über die Vererbung des Paraoxonasetyps zu machen. In Tabelle 9 sind weiterhin die Paraoxonasetypen angegeben, wobei die Bezeichnungen von Geldmacher-v. Mallinckrodt et al. (1973) gewählt wurden.

Tabelle 9

Vergleich der Gruppenzugehörigkeit nach beiden Methoden für die Prüfung des angenommenen Erbgangs

(1 - 1 niedrige, 2 - 1 mittlere, 2 - 2 hohe Paraoxonase-Aktivität bzw. Serumcholinesterase-Restaktivität)

Familiennamen	Vorname	Paraoxonase-Aktivität	Cholinesterase-Restaktivität	Paraoxonasetyp
Allraun	<u>Gerd</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Anneliese</u>	mittel	mittel	2 - 1
	Horst	mittel	mittel	2 - 1
	Frank	niedrig	niedrig	1 - 1
Bär	<u>Georg</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Anna</u>	mittel	mittel	2 - 1
	Renate	mittel	mittel	2 - 1
Bierlein	<u>Georg</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Annemarie</u>	mittel	mittel	2 - 1
	Martina	mittel	mittel	2 - 1
	Annette	mittel	mittel	2 - 1

Familiennamen	Vorname	Paraoxonase-Aktivität	Cholinesterase-Restaktivität	Paraoxonasetyp
Britting	<u>Heinrich</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Hilde</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Ingrid</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Hubert</u>	mittel	mittel	2 - 1
Gebhard	<u>Erhard</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Rosa</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Josef</u>	hoch	hoch	2 - 2
Greiner	<u>Emil</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Wilhelmine</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Gerd</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Theo</u>	mittel	mittel	2 - 1
Grimm	<u>Hans</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Margarete</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Barbara</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
Löhr	<u>Georg</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Luise</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Konrad</u>	mittel	mittel	2 - 1
Müller *	<u>Hans</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Rosa</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Siegfried</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Beate</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Rudolf</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
Müller *	<u>Karl</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Marliese</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Elke</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
Maier	<u>Sebastian</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Bernharda</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Theo</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Inge</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Stefan</u>	mittel	mittel	2 - 1
Pinzer	<u>Michael</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Margarete</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Barbara</u>	niedrig	niedrig	1 - 1

* nicht verwandt

Familiennamen	Vorname	Paraoxonase-Aktivität	Cholinesterase-Restaktivität	Paraoxonasetyp
Schmidt	<u>Wilhelm</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Emmi</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	Eva	niedrig	niedrig	1 - 1
	Gisela	niedrig	niedrig	1 - 1
	Rolf	niedrig	niedrig	1 - 1
	Udo	niedrig	niedrig	1 - 1
Schwab	<u>Fritz</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	<u>Anna</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	Angela	niedrig	niedrig	1 - 1
	Hermann	niedrig	niedrig	1 - 1
	Richard	niedrig	niedrig	1 - 1
Strobel	<u>Heinrich</u>	mittel	mittel	2 - 1
	<u>Lina</u>	niedrig	niedrig	1 - 1
	Irmi	mittel	mittel	2 - 1
	Hermann	niedrig	niedrig	1 - 1

In jeder einzelnen Familie kann eine Vererbung nach einem einfachen 2-Allele-Modell angenommen werden.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Familienuntersuchungen bei 15 Familien mit 29 Kindern dargestellt.

Tabelle 10

Serumparaoxonasetypen bei 15 Familien

Eltern		Kinder		
Paarungen	Familien	Typ		
	n	1 - 1 n	2 - 1 n	2 - 2 n
1 - 1 x 1 - 1	5	10	-	-
1 - 1 x 2 - 1	7	3	10	-
2 - 1 x 2 - 1	3	1	4	1
	15	14	14	1

VI D I S K U S S I O N

=====

Im folgenden Abschnitt soll ein Vergleich zu Arbeiten gezogen werden, die sich gleichfalls mit der Zuordnung menschlicher Seren zu einem bestimmten Paraoxonasetyp befaßt haben.

Die Grenzbereiche verschieden hoher Serumcholinesterase-Restaktivitäten, die wir bei unseren Probanden mit der Anti-ChE-Technik gemessen haben (s.Tab.8 Seite 30), stimmen genau mit den Angaben von Geldmacher-v. Mallinckrodt, Hommel et Dumbach (1979) (s.Tab.3 Seite 9) überein. Die Lücke der Serumcholinesterase-Restaktivitäten zwischen 7,2 und 11,0 Prozent der Ausgangsaktivität läßt sich durch unsere geringe Fallzahl erklären.

Es werden nun die Ergebnisse, die wir bei unseren Probanden mit der spektrophotometrischen Methode nach Krisch (1968a) gewonnen haben (s. Tab.7 Seite 28) mit den Messungen von Geldmacher-v. Mallinckrodt et al.(1973), die in Tabelle 5 Seite 12 wiedergegeben sind, verglichen. Man kann erkennen, daß die Grenze zwischen Gruppe II und III verschieden hoher Paraoxonase-Aktivität übereinstimmt. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Geldmacher-v. Mallinckrodt et al. (1973) teilen wir die Werte mit einer Paraoxonase-Aktivität von 160 U/l Serum eher der Gruppe II zu. Für diese Einstufung haben wir verschiedene Gründe: zum einen erscheint es nach dem Histogramm auf Seite 26 sinnvoll und zum anderen haben wir sämtliche Werte in diesem Bereich bei der Messung der Cholinesterase-Restaktivität nach der Anti-ChE-Technik der Gruppe II zugeordnet. Schließ-

lich haben wir einen Anhalt für unsere Einstufung bei der Darstellung des Erbgangs der verschiedenen Paraoxonasetypen gefunden. Wir halten es nach unseren Ergebnissen und den Arbeiten von Geldmacher- v. Mallinckrodt et al. (1973) für wahrscheinlich, daß der Polymorphismus der menschlichen Serumparaoxonase genetisch determiniert ist und einem einfachen 2-Allele-System folgt. Diesen Erbgang wollen wir exemplarisch bei der Familie Bär darlegen.

Georg Bär gehört sicher der Gruppe mit niedriger Paraoxonase-Aktivität, Paraoxonasetyp 1-1, an. Seine Tochter Renate kann der Gruppe II zugeteilt werden, also dem Paraoxonasetyp 2-1. Diese Eigenschaft kann sie nur von ihrer Mutter Anna Bär geerbt haben, die daher mit einer Paraoxonase-Aktivität von 164 U/l Serum und einer Cholinesterase-Restaktivität von 11,1 Prozent der Ausgangsaktivität dem mittleren Paraoxonasetyp 2-1 zuzuordnen ist.

Abschließend kann festgestellt werden, daß unsere Ergebnisse im wesentlichen mit früheren Untersuchungen über die verschiedenen Paraoxonasetypen übereinstimmen, wenn auch in den Grenzbereichen eine sichere Zuordnung zu einem bestimmten Paraoxonasetyp nicht sicher möglich ist.

VII Z U S A M M E N F A S S U N G

=====

Im menschlichen Serum findet sich ein Enzym, das Paraoxon spezifisch spalten kann, die Paraoxonase. Von uns wurden Seren von 59 Personen aus 15 Familien untersucht.

Die Ergebnisse der Messungen nach der direkten spektrophotometrischen Methode nach Krisch (1968a) bestätigten erneut, daß bei der Paraoxonase-Aktivität eine Mischverteilung von drei Verteilungen mit niedriger, mittlerer und hoher Aktivität vorliegt. Das Histogramm unserer Messungen auf Seite 26 stimmt weitgehend mit dem optischen Bild der Ergebnisse von Zech u. Zürcher (1974) und den eigenen Fällen (s.Abb.2 Seite 11) überein.

Die darauffolgenden Untersuchungen nach der Anti-ChE-Technik (Geldmacher-v. Mallinckrodt, et al. (1969) ergaben ebenfalls, daß man die Serumcholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($c=3,2 \times 10^{-8} \text{ M}$) in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Aktivität einteilen kann. Die von uns gefundene Häufigkeitsverteilung der drei Gruppen (s.Abb.5 Seite 29) bestätigt die Angaben von Dumbach (1976) (s.Abb.1 Seite 8). Die Tatsache, daß wir nur einen Probanden als Vertreter des hohen Typs der Paraoxonase-Aktivität angeben können ist durch die geringe Fallzahl und durch den niedrigen prozentualen Anteil des hohen Typs bedingt. Dieser Proband ist aber sowohl nach der direkten spektrophotometrischen Methode nach Krisch (1968a) als auch nach der Anti-ChE-Technik (Geldmacher-v. Mallinckrodt,

et al., 1969) der einzige Vertreter des hohen Paraoxonase-typs.

Entscheidend war der Nachweis, daß jedes Serum bei Anwendung beider Methoden derselben Gruppe zuzuordnen ist. Somit kann erneut gezeigt werden, daß die Bestimmung der Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Para-oxon ($c = 3,2 \times 10^{-8}$ M) eine ebenso geeignete Methode zur Messung der Paraoxonase-Aktivität ist wie das photometrische Verfahren nach Krisch (1968a), wenn man die folgenden Grenzen zwischen den einzelnen Gruppen annimmt:

Gruppe	photometrische Methode (U/l Serum)	Anti-ChE-Technik (Rest- aktivität in % der Aus- gangsaktivität)
I	40 - 100	0,9 - 7,2
II	160 - 350	11,0 - 39,0
III	> 350	> 39,0

Die so gewonnene Einteilung in die drei Gruppen erscheint auch deshalb richtig, weil die Ergebnisse der Familienunter-suchung in keinem Fall der Annahme widersprachen, daß die Vererbung der Paraoxonasegruppen nach einem einfachen 2-Al-lele-Modell erfolgt. Um die Ergebnisse unserer Arbeit zu bestätigen, wäre eine qualitative Methode zur Erkennung der drei Paraoxonasetypen erforderlich.

VIII L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

Aldridge, W.N.:

Serum esterases. 1. Two types of esterases (A und B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.

Biochem. J. 53, 110 (1953a)

Aldridge, W.N.:

Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenylphosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.

Biochem. J. 53, 117 (1953b)

Ammon, R.:

Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)

Augustinsson, K.-B.:

Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds.

IV. Specifity studies.

Acta chem. scand. 8, 1533 (1954)

Augustinsson, K.-B., Heimbürger, G.:

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 13, 303 (1954)

Augustinsson, K.-B., Heimbürger, G.:

Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds.

V. Effect of phosphorylphosphatase on the inactivation of cholinesterases by organophosphorus compounds in vitro.

Acta chem. scand. 9, 310 (1955)

Baumgartner, W.:

Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen fermentativem E 600-Abbau und Vergiftung der Cholinesterase durch E 600 im menschlichen Serum.

Dissertation, Erlangen, 1970

Burgis, H.-J.:

Untersuchungen über den fermentativen Abbau von E 600, Methyl-E 600, E 605 und Methyl-E 605 im menschlichen Serum. Dissertation, Erlangen, 1972

Dietzel, B.:

Untersuchungen über den fermentativen Abbau von E 600, Monomethyl-E 600 und p-Nitrophenylphosphat im menschlichen Serum.

Dissertation, Erlangen, 1974

Dumbach, J.:

Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serumpa-raoxonase. (EC 3.1.1.2)

Dissertation, Erlangen, 1976

Erdös, E.G., Boggs, L.E.:

Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.

Nature (Lond.) 190, 716 (1961)

Flügel, M.:

Zur Kinetik des Paraoxon-spaltenden Enzyms im menschlichen Serum.

Dissertation, Erlangen, 1977

Friedberg, K.D., Sakai, F.:

Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots. (Pyridin-Aldoxim-Methyljodid-PAM).

Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Rabast, U., Lindorf, H.H.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat).

Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Baumgartner, W., Petenyi, M.,
Burgis, H., Lindorf, H.H. und Metzner, H.:

Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der
Serum-Cholinesterase durch E 600 und der Aktivität des E 600-
spaltenden Enzym-Systems in menschlichen Seren.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Lindorf, H.H., Petenyi, M.,
Flügel, M., Fischer, Th., Hiller, T.:

Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen Se-
rum-Paraoxonase (E C 3.1.1.2).

Humangenetik 17, 331 (1973)

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Hommel, G., et Dumbach, J.:

On the Genetics of the Human Serum

Paraoxonase (E C 3.1.1.2).

Humangenetik 50, 313 (1979)

Krisch, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-phosphat
(E 600) durch menschliches Serum.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6, 41 (1968a)

Krisch, K.:

persönliche Mitteilung (1968b)

Main, A.R.:

The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitro-
phenyl-phosphate (Paraoxon) in sheep serum.

Biochem. J. 74, 10 (1960)

Metzner, H.:

Vergleichende Untersuchung zur Hydrolyse von E 600, Chlor-
thion und P=O Chlorthion durch menschliche Serumenzyme.

Dissertation, Erlangen, 1973

Nirschl, H.:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonasen.

Versuche mit m-, o- und p-Nitro-E 600.

Dissertation, Erlangen, 1972

Renner, O.:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonasen.
Versuche mit Paraoxon, n-propyl-Paraoxon und iso-propyl-Paraoxon.

Dissertation, Erlangen, 1973

Schrader, G.:

Chlorthion: Ein neues, wenig giftiges Insektizid aus der Reihe der Thiphosphorsäureester.

Angewandte Chem. 66, 265 (1937)

Schuckmann, P.:

Einfluß von Äthylenglykol auf die hydrolytische und enzymatische Spaltung von Paraoxon [E-600 (0,0-Diäthyl-0-(p-nitrophenyl)-phosphat)].

Dissertation, Erlangen, in Vorbereitung

Skrinjarik-Spoljar, M., Reiner, E.:

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenyl-phosphate and ethyl-p-nitrophenyl-ethylphosphate by human sera.

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 165, 289 (1968)

Süllmann, E.:

Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebestoffwechsels.

in: Lang, K. und Lehnartz, E. Hrgb.:

Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse.

Bd. IV. Teil a: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1964)

Zech, R., Zürcher, K.:

Organophosphate splitting serum enzymes in different mammals.

Comp. Biochem. Physiol. (B) 48, 427 (1974)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling meinen Dank aussprechen für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, insbesondere aber für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Recht herzlich möchte ich Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt danken für die Überlassung des Themas, ihre außergewöhnlich große Hilfsbereitschaft und den zu jeder Zeit so freundlich erteilten Rat.

Besonderen Dank schulde ich allen Probanden, die durch Ihre Blutspende diese Arbeit ermöglichen.

Lebenslauf

Personalien: Heinrich Grimm
geb. 17. Oktober 1952 in Rollhofen
Staatsangehörigkeit:deutsch
Eltern: Lorenz Grimm, Schmiedemeister
Marie Grimm, geb. Kroder

Ausbildung: 1959-1964 Volksschule in Rollhofen
1964-1973 Gymnasium in Nürnberg
8.6.1973 Abitur
1973-1974 Wehrpflicht in der Bundeswehr
SS 1974 - Studium der Humanmedizin an der
WS1979/80 Universität Erlangen-Nürnberg
26.3.1976 Ärztliche Vorprüfung
9.5.1980 Ärztliche Prüfung

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197